

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-266798

(43) 公開日 平成9年(1997)10月11日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/56		7823-4B	C 1 2 Q 1/56	
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	T
33/86			33/86	

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 5 項)

(21) 出願番号 特願平8-77301

(22) 出願日 平成8年(1996)3月29日

(71) 出願人 000003182

株式会社トクヤマ

山口県徳山市御影町1番1号

(72) 発明者 松田 徳子

山口県徳山市御影町1番1号 株式会社トクヤマ内

(73) 発明者 岡田 昌人

山口県徳山市御影町1番1号 株式会社トクヤマ内

(54) 【発明の名称】 トロンビン活性の測定法および凝集試験

(57) 【要約】

【課題】 従来行われていたトロンビン活性測定法の測定範囲の考慮や煩雑な操作、他の生体成分の影響を考慮することなく、簡便かつ短時間にトロンビン活性測定を行うこと。

【解決手段】 フィブリノーゲンを担持した不溶性担体に被検体を作用させ、凝集量を測定することにより、被検体中のトロンビン活性を測定する。

(2)

特開平9-266798

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フィブリンノーゲンを担持した不溶性担体に被検体を作用させ、該担体の凝集度を測定することによりトロンビン活性を決定することを特徴とするトロンビン活性の測定法。

【請求項2】 フィブリンノーゲンを担持した不溶性担体からなることを特徴とする凝集試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は被検体中のトロンビン活性を簡便かつ正確に測定するための方法およびこれに使用する凝集試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】トロンビン活性の測定は、被検体が血液由来である場合、血液凝固第II因子の定量に用いられる方法である。血液凝固第II因子（プロトロンビン）は、活性化第X因子により活性化されトロンビンとなる。トロンビンはフィブリンノーゲンをフィブリンに転化する反応を触媒する作用を持ち、血液凝固の最終段階に関与する重要な因子である。凝固系の因子のなかでもっとも多量に血液中に存在し、肝臓で合成されるビタミンK依存性因子の一つである。

【0003】血液凝固第II因子の先天性欠乏症、分子異常症はきわめて少ないが、ビタミンK欠乏症ではトロンビン活性が著しく低下する。また、肝傷害、播種性血管内凝固症候群（DIC）でもプロトロンビン量は減少する。

【0004】従来上記血液凝固第II因子の定量法には、血液凝固第II因子をトロンビンに転化してトロンビン活性を測定する凝固時間法や合成基質法、また、血液凝固第II因子のタンパク量を測定する免疫学的的方法がある。

【0005】凝固時間法では、被検体に血液凝固第II因子欠乏血漿を加えて血液凝固第II因子以外の全ての因子を補正した後凝固開始剤を加え、凝固時間、即ちトロンビンによるフィブリン転化にかかる時間を測定することにより血液凝固第II因子の正常血漿に対する相対量を求める。

【0006】合成基質法によるトロンビン活性の測定方法では、血液凝固第II因子をトロンビンに転化した後、トロンビンのプロテアーゼ作用に対して特異性の高い発色性合成基質を用いて希釈被検体のトロンビン活性を測定する。

【0007】免疫学的方法では抗血液凝固第II因子抗体を用いて血液凝固第II因子のクンバク量を測定する。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記のように血液凝固第II因子量の測定法は数多くあるが、それぞれ問題点がある。

【0009】凝固法は一般的に用いられている方法であるが、凝固時間を測定するため、使用試薬により、また

ロットにより測定値が異なる等の諸問題点がある。また、市販の凝固因子欠乏血漿が高価であるという問題点がある。

【0010】発色基質法は前記するローエンドアッセイの検出感度が405nmであるため、被検体中の他の成分、特にビリルビン系色素の影響を大きく受けてしまうという欠点を有し、また、測定範囲が狭く、検体希釈しなければならないという問題を持つ。また、合成基質がトロンビン以外のプロテアーゼ（特にトリプシン）によって阻害されてしまう阻害性を持ち、さらに、合成基質が高価であるという問題点もある。

【0011】免疫学的方法では、トロンビン活性を持たない異常分子も正常分子として測定されるため、血液凝固第II因子量と活性トロンビン量とが入り交じることがある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、血中での正確な測定結果が得られる測定範囲の広いトロンビン活性の測定法を鋭意研究した結果、フィブリンノーゲンを担持した不溶性担体とトロンビンを含む被検体を作用させ、両者による凝集度の変化量を測定することによりトロンビン活性を決定することができることを見い出して、本発明を完成させるに至った。

【0013】即ち、本発明は、フィブリンノーゲンを担持した不溶性担体に被検体を作用させ、該担体の凝集度を測定することによりトロンビン活性を決定することを特徴とするトロンビン活性測定法である。

【0014】他の発明は、フィブリンノーゲンを担持した不溶性担体を含むことを特徴とする凝集試薬である。

【0015】本発明で用いられるフィブリンノーゲンは、特に限定されずヒト、動物由来または遺伝子組換えによるものが用いられるが、被検体中のトロンビンが作用可能であることが必要であり、被検体がヒト由来のものである場合はヒト由来のフィブリンノーゲンであることが望ましい。

【0016】本発明で用いられる不溶性担体は、フィブリンノーゲンを担持でき、担持後の担体のトロンビンの作用により凝集するものであれば公知の担体の何れに制限されずに使用できる。

【0017】このような担体を例示すれば、右記高分子粒子、無機物質粒子、生物由来粒子等が挙げられる。右記高分子粒子としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストラン、ラテックス粒子が例示できる。無機物質粒子としてはシリカ、シリカ-アルミナ、アルミナあるいはそれらにシランカップリング処理を施し官能基を導入した粒子等が挙げられる。生物由来粒子としてはヒトの赤血球、ヒツジ赤血球等が挙げられる。好適に使用できる担体を例示すれば、ポリスチレン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル（メタ）アクリレート共重合体、スチレン-スチ

(3)

特開平9-266708

レンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体等のラテックス粒子である。これらの粒子の粒径は特に限定されるものではないが、測定機器によって0.05~0.50 μ mのものを適宜選べばよい。担体の使用量は測定機器によって適宜決定すればよいが、一般に測定溶液中に0.0001~10重量%となる量用いるのが望ましく、懸濁液の状態で使用するのが好ましい。

【0018】本発明でいう被検体とは、測定対象であるトロンビンを含む血液、血清、血漿、唾液、尿、便、培養物、培養液、もしくは細胞内液等の液体またはそれらの抽出液を言う。なお、被検体が血液、血清、血漿の場合は被検体中にプロトロンビンとトロンビンが混在している可能性がある。被検体中のプロトロンビン量測定が目的の場合は、被検体にトロンボプラスチン液を加え、プロトロンビンをトロンビンに転化させた後、トロンビン活性測定を行う。

【0019】本発明でいう凝集とは、フィブリノーゲン担持不溶性担体同士が反応により結合した状態をいう。凝集量は肉眼的にまたは光学的に測定が可能である。肉眼的に凝集量を測定する方法は、スライド上で各濃度の被検体の凝集反応を行い、凝集像の変化を肉眼であるいは機械的に画像処理を行うことで検出する方法である。溶液中の担持担体の凝集を光学的に検出する方法は、散乱光強度、吸光度または透過光強度等の光学密度量を測定する光学機器で測定を行う。光学機器での凝集量測定は、用いる不溶性担体の粒径あるいは濃度により選択した好適な波長で、凝集反応開始時と終了時の2回の光学密度量の差を測定する方法と、単位時間当たりの光学密度量の増加もしくは減少の変化量を測定する方法により行う。また、これらの方法を併用することも可能である。単位時間当たりの光学密度変化量の測定は高い定量性を有するため、凝集量の測定に好適に用いられる。

【0020】フィブリノーゲンを不溶性担体に担持させる方法としては、物理的吸着法と化学的結合法が従来知られているが、担持操作の簡便な物理的吸着法が好適に選択される。担持操作は通常フィブリノーゲン溶液と不溶性担体溶液を混合して行われる。

【0021】フィブリノーゲンの不溶性担体への担持は、通常緩衝液等の媒体中で不溶性担体1g当たり0.1~100mgのフィブリノーゲンをを用いて担持操作を行う。

【0022】担持操作は特に限定されないが、通常pH4~8の緩衝液で行う。担持操作は通常1~60℃の範囲で行うが、20~40℃が好適である。担持操作時間は10分~48時間が好適であり、担持操作中溶液は静置、振盪あるいは攪拌する。

【0023】担持操作後遠心分離等の分離操作により担持粒子を取り出し試薬原料とするのが好ましい。

【0024】フィブリノーゲン担持粒子はこのまま、あ

るいは安定化操作を施した後、試薬として用いることができる。安定化操作とは代表的には、アルミニウムやゼイン等の蛋白や界面活性化剤でさらに過剰の担持操作を行う操作をいう。

【0025】フィブリノーゲン担持担体と被検体を反応させ、フィブリノーゲン担持担体の凝集を行わせる条件としては、従来から知られているトロンビンの作用条件から適宜選択して採用すればよいが、トロンビンの最適pH、最適温度の付近で行い、トロンビンの活性が最大に発現される条件が望ましい。

【0026】トロンビン活性測定に用いる前記フィブリノーゲン担持担体の使用量は、被検体の種類により適宜選択されるが、代表的には測定溶液中に0.0001~10重量%の濃度となる量がよい。

【0027】測定反応液量は、通常0.1~10mlの範囲で行われる。pH条件としては、通常4.0~10.5が採用されるが、好ましくは6.5~8.0の範囲が好適であり、これらの範囲のpHを維持するために適宜緩衝液を用いる。緩衝液の種類は特に限定されないが、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等の公知の緩衝液が用いられる。この緩衝液の濃度は特に限定されないが、例えば1~500mMの範囲が好適である。温度条件としては、15~60℃の範囲が一般的であるが、30~40℃の範囲が好適である。

【0028】本発明におけるトロンビン活性の測定は、被検体、フィブリノーゲン担持担体の2成分が溶液中に存在してはじめて反応が進行し可能となる。従って、通常はこの2つの成分の内1成分を含んだ溶液を調整し、設定した条件に達した後、残りの1成分を加えることで反応を開始させ定量に供する手段が採用される。最後に加える成分は限定されないが、被検体を最後に加えるのが一般的である。

【0029】トロンビン活性の測定に必要な時間は、反応条件、測定対象となるトロンビン濃度等によって異なり、一概に限定できないが、好ましくは設定された条件において、その光学密度変化量を測定できるに十分な時間であることが望ましい。そのような反応時間としては1分~5時間の範囲が通常採用されるが、1分~30分の範囲が好適である。

【0030】本発明では、既知活性のトロンビン溶液と被検体を各々フィブリノーゲン担持担体と反応させ、生じた凝集の度合を光学的に観察し比較することによって被検体中のトロンビン活性が測定される。具体的に、まず既知活性のトロンビン標準溶液を複数測定し、得られた光学密度変化量とトロンビン活性の相関から検量線を作成する。次に被検体を測定しその光学密度変化量から検量線を利用してトロンビン活性を求める。

【0031】担持担体の凝集の度合を光学的に検出する方法においては、測定は散乱光強度、吸光度または透過光強度を測定する光学機器で行う。測定波長は300~

(1)

特開平9 266798

2400nmの範囲から適切な波長が選択される。定量方法については公知の方法に従い、用いる不溶性担体の粒径あるいは濃度の選択、反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度または透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行う。また、これらの方法を併用することも可能である。

【0032】本発明によるフィブリノーゲン担持担体を含む試薬では、トロンビン活性そのものの測定以外に、被検体が血漿あるいは血清である場合、血液凝固因子欠乏血漿と組み合わせることにより、該血液凝固因子の相対量を測定することが可能である。また、既知量のトロンビンを存在させることにより被検体中のトロンビン阻害物質の定量を行うことも可能である。

【0033】

【発明の効果】本発明によるトロンビンの活性測定法は、従来行われていた凝固法や合成基質法の煩雑な操作や高価な試薬、他の生体成分の影響を考慮することなく、簡便にトロンビンの活性測定を行うことができる。また、測定範囲が広いため、検体の希釈操作を行うことなく汎用の生化学自動分析装置を用いて測定することが可能なため、従来の測定法に比較して、格段に多数の検体を測定することができる。従って、日常の作業としてトロンビンの活性測定が簡便かつ短時間に、しかも精度良く実施出来るようになった。

【0034】

【実施例】以下実施例を上げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に記載の範囲に限定されるものではない。

【0035】実施例1

(1) フィブリノーゲン担持ラテックス懸濁液の調製
平均粒子径0.23 μ mのスチレン-グリシジルメタアクリレート共重合体粒子をpH8.2の0.05Mホウ酸ナトリウム緩衝液（以下BBと略す）で希釈してラテックス濃度が1%（w/v）の懸濁液を5ml調製した。次いでフィブリノーゲン（Kabi Vitrum社製 Grade L）をBBで希釈した溶液（0.4mg/ml）を5ml加え、混合した。25℃で1時間振とうした後、ウシ血清アルブミン（Sigma社製 Fraction V）をBBにて1%（w/v）に調製した液を5ml添加し、さらに4時間振とうした。次ぎに遠心分離により得られた沈殿（フィブリノーゲン担持ラテックス）に20mlの0.1M塩化ナトリウムを含むpH7.5の0.1Mトリス塩酸緩衝液を加えてフィブリノーゲン担持ラテックス液を調製した。

【0036】(2) トロンビン標準液の調製

ヒト血漿トロンビン（コスモバイオ社製）を0.1M塩化ナトリウムを含むpH7.5の0.1Mトリス塩酸緩衝液に溶解、希釈して0、10、50、100、200、400U/mlの標準液を調製した。

【0037】(3) 測定法

(1) のフィブリノーゲン担持ラテックス液0.25mlに0.1M塩化ナトリウムを含むpH7.5の0.1Mトリス塩酸緩衝液0.55mlを加えた液に、被検体0.3mlを添加し、30秒後から5分後までの波長660nmにおける吸光度変化量を測定した。

【0038】(4) 活性算出法

(3) の測定法で各トロンビン標準液及び生理食塩水（ブランク）の吸光度変化量を測定して表1の測定値を得た

【0039】

【表1】

トロンビン活性 (U/ml)	吸光度変化量 (660nm)
0	0
10	0.002
50	0.0031
100	0.0175
200	0.0381
400	0.0444

【0040】この測定値より図1の検量線を作成した。得られた検量線より、本測定法は広い範囲のトロンビン活性を測定可能であることがわかる。

【0041】次いで未知の被検体1~4を測定して吸光度変化量測定値を得、前記検量線を用いてトロンビン活性を算出した結果を表3に示す。

比較例1

トロンビン活性測定用発色基質（第一化学薬品社製 テストチーム発色基質S-2238）を用い、説明書に従って吸光度を測定し、表2の測定値を得た。この測定値より図2の検量線を作成した。

【0042】

【表2】

トロンビン活性 (U/ml)	吸光度 (405nm)
0	0
0.5	0.0625
1	0.127
1.5	0.174
2	0.226
2.5	0.254
3	0.268

【0043】次いで未知の被検体1~4を測定して吸光度変化量測定値を得、それぞれ前記検量線を用いてトロンビン活性を算出した結果を表3に示す。

【0044】本発明の方法と比較例の方法で測定したトロンビン活性値の算出値を図3に示す。図3から通う、本発明の方法と比較例の方法は同等性がなかった。

【0045】

【表3】

(5)

時間平均: 266798

被検体	比較例 吸光度	比較例 活性算出	本法 吸光度	本法 活性算出
1	0.803	9	0.0022	11
2	5.972	47	0.0084	52
3	12.32	97	0.0177	101
4	25.03	197	0.0391	205

【図面の簡単な説明】

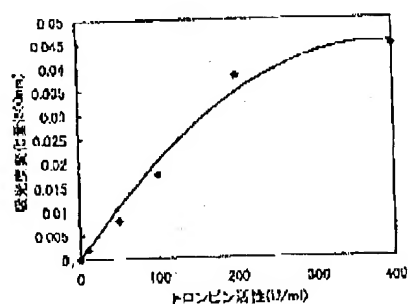
【図1】 本発明に従って作成したトロンビン活性の検量線の図である。

【図2】 比較例に従って作成したトロンビン活性の検

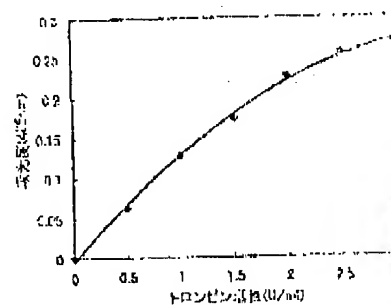
量線の図である。

【図3】 本発明に従って測定したトロンビン活性を比較例で測定したトロンビン活性の相対図である

【図1】



【図2】



【図3】

